บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องผสมสาร (Magnetic stirrer) Laboratory Hot Plate รุ่น PC-101 บริษัท Corning Glass Works, Corning, Ltd., NY ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตู้อบไมโครเวฟ รุ่น NE-7670 ยี่ห้อ National บริษัท Matsushita Electric Indrustrial Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น 501 บริษัท Horiba ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องอบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (Hot air oven) รุ่น 94789 บริษัท Contherm Scientific, Ltd. ประเทศนิวซีแลนด์

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ยี่ห้อ Cambridge บริษัท Dwyer Instrument, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-26 บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation ประเทศญี่ปุ่น และรุ่น KT-30SD บริษัท ALP Co., Ltd., Tokyo ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) รุ่น Vortex-Genie No.2 บริษัท Scientific Industries, Inc. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Z230 บริษัท Hermle AG., Ltd. ประเทศเยอรมันนี

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น G68 บริษัท New Brunswick Scientific Co., Ltd. ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องชั่งละเอียด รุ่น AE-240 ยี่ห้อ Mettler บริษัท Mettler Instrumente AG., Ltd. ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เครื่องชั่งหยาบ รุ่น PM6100 ยี่ห้อ Mettler บริษัท Mettler Instrumente AG., Ltd. ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography) รุ่น GC-15A บริษัท Shimadzu Co., Ltd. ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
โซเดียมไฮดรอกไซด์	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
กรดไฮโดรคลอริก	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
เอทานอล	กรมสรรพสามิต	ประเทศไทย
คลอรอกซ์	THE CLOROX	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไทรทรอน เอ็กซ์-100	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
กรดแนฟทาลีนแอซีติก	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
กรดอินโดลแอซีติก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดอินโดลบิวทิริก	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
ทู, โฟร์-ดี	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
เบนซิลอะดีนีน	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
ไคเนทิน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ซูโครส	มิตรผล	ประเทศไทย
ฟรุกโทส	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
ซอร์บิทอล	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
ผงวุ้น	นางเงือก	ประเทศไทย
แอมโมเนียมไนเทรต	AJAX	ประเทศออสเตรเลีย
โพแทสเซียมไนเทรต	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปทะไฮเดรต	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
กรดบอริก	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
แมงกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
ซิงค์ซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
โพแทสเซียมไอโอไดด์	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
โซเดียมโมลิบเดตไดไฮเดรต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนทะไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
โคบอลท์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
ไดโซเดียมเอทิลีนไดอะมีนเททระแอซีติก	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
เฟอรัสซัลเฟตเฮปทะไฮเดรต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต	MERCK	ประเทศเยอรมันนี
แอมโมเนียมซัลเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
กรดนิโคทินิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไพริดอกซิน-ไฮโดรคลอริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไทมีน-ไฮโดรคลอริก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไกลซีน	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
ไมโอ-อิโนซิทอล	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
เอทิลมีเทนซัลโฟเนต	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไดเมทิลซัลฟอกไซด์	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
เฮกเซน	MALLINCKRODT	ประเทศสหรัฐอเมริกา
แอบโซลูทเมทานอล	MALLINCKRODT	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดซัลฟิวริก	MALLINCKRODT	ประเทศสหรัฐอเมริกา
โซเดียมคลอไรด์	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
โซเดียมซัลเฟตแอนไฮดรัส	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
น้ำแข็งแห้ง	TIG	ประเทศไทย
แก๊สไนโตรเจน	TIG	ประเทศไทย
แก๊สไฮโดรเจน	TIG	ประเทศไทย
กรดไขมันมาตรฐาน	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
และ	NU-CHEK-PREP	ประเทศสหรัฐอเมริกา

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2 เมล็ดพันธุ์คำฝอย

งานวิจัยนี้ใช้เมล็ดคำฝอย (*Carthamus tinctorius* Linn.) พันธุ์ Munjira ของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ นำมาเพาะเลี้ยงในสภาพปลอดเชื้อเพื่อให้ได้ต้นกล้าสำหรับตัดแยกชิ้นส่วนต่าง ๆ ไปทำการทดลองต่อไป

2.3 อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

สูตรอาหารที่ใช้ ได้แก่ MS (Murashige and Skoog, 1962), LS (Linsmaier and Skoog, 1965), B5 (Gamborg, Miller and Ojima, 1968) และ SH (Schenk and Hildebrandt, 1972) องค์ประกอบของอาหารแต่ละชนิดและวิธีการเตรียม อธิบายในภาคผนวก ก

2.4 การเตรียมตัวอย่างพืชและการฟอกฆ่าเชื้อ

นำเมล็ดคำฝอยมาทำให้ปลอดเชื้อตามวิธีของ Anupan Kongbangkerd (1995) โดยแช่เมล็ดในคลอรอกซ์ 10% ที่เติมไทรทรอนเอ็กซ์–100 0.05% เป็นเวลา 15 นาที ล้างตามด้วยน้ำขจัดไอออนนึ่งฆ่าเชื้อ 4 ครั้ง เพาะเมล็ดที่ฆ่าเชื้อแล้วบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต มีซูโครส 2.0% วุ้น 0.7% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 โดยเลี้ยงให้เมล็ดงอกที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ไม่ให้แสง จนได้ต้นกล้าที่เป็นแหล่งของชิ้นส่วนพืช ได้แก่ ใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบเลี้ยง เพื่อใช้เป็นพืชทดลองต่อไป

2.5 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมของการใช้สาร EMS เพื่อการชักนำให้คำฝอยเกิดการกลายพันธุ์ในสภาพปลอดเชื้อ

2.5.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร EMS เพื่อชักนำให้คำฝอยเกิดการกลาย-พันธุ์

2.5.1.1 การใช้สารละลาย EMS ในช่วงความเข้มข้น 1.0-5.0%

ตามรายงานของ Anupan Kongbangkerd (1995) พบว่า ใบเลี้ยงคำฝอยที่ได้จากต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ เป็นเนื้อเยื่อที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดแคลลัสและมี

การพัฒนาไปเป็นต้นได้ จึงนำชิ้นส่วนใบเลี้ยงของต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ ที่ได้จากข้อ 2.4 มาให้สาร EMS โดยแช่ในสารละลาย EMS ที่มีความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0% ซึ่งเตรียมในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ความเป็นกรด-ด่าง 7.0 (ภาคผนวก ข-1.) และเติมสารตัวพา (carrier agent) คือ DMSO 4.0% เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ล้างใบเลี้ยงด้วยน้ำขจัดไอออนนึ่งฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง ย้ายลงเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 2.0% วุ้น 0.7% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เปรียบเทียบกับ control คือ ไม่ใช้สาร EMS โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ในสภาพที่ไม่ให้แสง เป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นย้ายไปเลี้ยงในสภาพที่ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 3000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน จนเกิดแคลลัส และเปลี่ยนอาหารทุก 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD (Complete Randomized Design) จำนวน 50 ซ้ำ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ ทำการคำนวณค่าเฉลี่ยระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อ ร้อยละการเกิดแคลลัส และร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส ภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 2, 4 และ 6 สัปดาห์ ตามลำดับ โดยให้ระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อแบ่งเป็น 6 ระดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละการเกิดสีน้ำตาลของพื้นที่ใบเลี้ยง ดังรูปที่ 2.1

2.5.1.2 การใช้สารละลาย EMS ในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.0%

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1.1 แต่ใช้สาร EMS ที่ระดับความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.8 และ 1.0% และใช้วิธีการเตรียมสารละลาย EMS ที่แตกต่างกัน คือ เตรียมสารละลาย EMS ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.0 และเตรียมในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 วัดผลในทำนองเดียวกันกับที่กล่าวไว้ข้างต้น

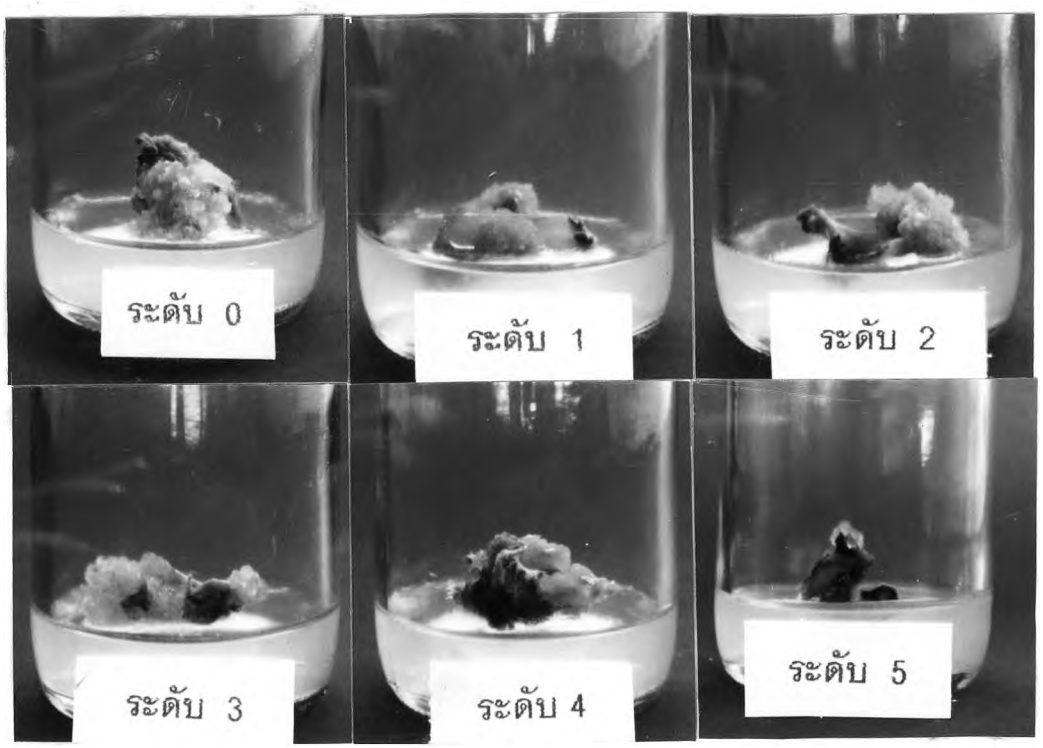
2.5.2 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารตัวพา DMSO

จากผลที่ได้ในข้อ 2.5.1 เลือกใช้วิธีการเตรียมสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.8% ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารตัวพา คือ DMSO ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1.1 โดยใช้สาร DMSO ความเข้มข้น 1.0, 2.0, 3.0 และ 4.0% เปรียบเทียบกับการทดลองที่ไม่ใช้สาร EMS และ DMSO วัดผลในทำนองเดียวกันกับที่กล่าวไว้ข้างต้น

2.5.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการให้สาร EMS

จากผลที่ได้จากข้อ 2.5.1 และ 2.5.2 เลือกใช้วิธีการเตรียมสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.8% ในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 และใช้สารตัวพา คือ DMSO ความเข้มข้น 4.0% เพื่อหาระยะเวลาของการ

ให้สาร EMS ที่เหมาะสม โดยให้สาร EMS เป็นเวลานาน 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1.1 สังเกตและบันทึกการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในทำนองเดียวกันกับข้างต้น



รูปที่ 2.1 แสดงความเสียหายระดับต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อใบเลี้ยงภายหลังจากให้สาร EMS เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

ระดับ 0 ไม่เกิดสีน้ำตาลบนใบเลี้ยง
ระดับ 1 เกิดสีน้ำตาลไม่เกิน 20% ของพื้นที่ใบเลี้ยง
ระดับ 2 เกิดสีน้ำตาลมากกว่า 20% แต่ไม่เกิน 40% ของพื้นที่ใบเลี้ยง
ระดับ 3 เกิดสีน้ำตาลมากกว่า 40% แต่ไม่เกิน 60% ของพื้นที่ใบเลี้ยง
ระดับ 4 เกิดสีน้ำตาลมากกว่า 60% แต่ไม่เกิน 80% ของพื้นที่ใบเลี้ยง
ระดับ 5 เกิดสีน้ำตาลมากกว่า 80% ของพื้นที่ใบเลี้ยง

2.6 ศึกษาความแปรปรวนของต้นคำฝอยที่ได้จากการชักนำด้วยสาร EMS ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ตามการทดลองในข้อ 2.5.1.2 เนื่องจากการใช้สาร EMS กับใบเลี้ยงในช่วงความเข้มข้น 0.2-1.0% แคลลัสมีการพัฒนาเป็นยอดได้ จึงทำการย้ายยอดที่มีใบจำนวน 4-5 ใบ ความสูง 1.5-2.0 เซนติเมตร ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต มีซูโครส 2.0% วุ้น 0.7% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 ในสภาพที่ให้แสงฟลูออเรสเซนต์ 3000 ลักซ์ นาน 16 ชั่วโมงต่อวัน เพื่อชักนำให้ยอดสร้างรากตามวิธีการของ Anupan Kongbangkerd (1995) สังเกตและบันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของต้นคำฝอยภายใต้สภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่

ก. การยืดยาวของปล้อง

ข. การอวบน้ำของใบ

ค. รูปร่างใบ

ง. ลักษณะของหนาม

จ. จำนวนหนามที่ใบ (นับจากใบที่ 1, 3 และ 5 จากโคนต้น นำมาหาค่าเฉลี่ย)

ฉ. ขนาดของใบ (วัดความกว้างและความยาวของใบที่ 1, 3 และ 5 จากโคนต้นนำมาหาค่าเฉลี่ย)

ช. ความสูง (วัดจากโคนต้นจนถึงปลายยอด)

ซ. อายุการออกดอก

โดยบันทึกลักษณะต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น (ยกเว้นอายุการออกดอก) ภายหลังจากวันที่ทำการย้ายยอดลงเลี้ยงบนอาหารเพื่อชักนำให้เกิดรากเป็นเวลา 30 วัน

2.7 ศึกษาปัจจัยที่ทำให้เกิดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของต้นคำฝอยในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

2.7.1 ชนิดของชิ้นส่วนพืช

นำต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ มาตัดแยกใบเลี้ยงและลำต้นใต้ใบเลี้ยง (ความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร) เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 2.0% วุ้น 0.7% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 บ่มเนื้อเยื่อไว้ภายใต้สภาพที่ระบุในข้อ 2.5.1.1 เพื่อชักนำให้เกิดยอดจากแคลลัส แล้วนำยอดที่ได้ย้ายไป

เลี้ยงบนอาหารเพื่อนำให้เกิดรากตามที่กล่าวไว้ในข้อ 2.6 ทำการทดลอง 30 ซ้ำต่อการทดลอง สังเกตการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ โดยคำนวณร้อยละการเกิดแคลลัสและร้อยละการพัฒนาไปเป็นยอดของแคลลัส ภายหลังเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 4 และ 6 สัปดาห์ ตามลำดับ รวมทั้งบันทึกลักษณะการเจริญเติบโตของต้นคำฝอยเหมือนกับข้อ 2.6

2.7.2 อายุของชิ้นส่วนพืช

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.7.1 แต่ใช้ชิ้นส่วนใบเลี้ยงที่ตัดแยกมาจากต้นกล้าอายุต่าง ๆ ได้แก่ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ บันทึกผลเช่นเดียวกับข้อ 2.7.1

2.7.3 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

นำชิ้นส่วนใบเลี้ยงจากต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ ไปเพาะบนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ได้แก่ MS, LS, B5 และ SH แต่ละสูตรมี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 2.0% วุ้น 0.7% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 บ่มเนื้อเยื่อภายใต้สภาพเดียวกันกับข้อ 2.5.1.1 สังเกตและบันทึกการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับข้อ 2.7.1

2.7.4 ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต

2.7.4.1 การใช้ BA ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ

นำใบเลี้ยงจากต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติมไซโทไคนิน คือ BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ ได้แก่ NAA, IAA, IBA และ 2,4-D ชนิดละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร มีซูโครส 2.0% วุ้น 0.7% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 โดยเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อภายใต้สภาพเช่นเดียวกับ ข้อ 2.5.1.1 สังเกตและวัดผลการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.7.1

2.7.4.2 การใช้ Kinetin ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.7.4.1 แต่ใช้ไซโทไคนิน คือ Kinetin 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ร่วมกับออกซินชนิดต่าง ๆ ได้แก่ NAA, IAA, IBA และ 2,4-D ชนิดละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สังเกตและบันทึกผลในทำนองเดียวกันกับที่กล่าวไว้ข้างต้น

2.7.5 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

ตัดใบเลี้ยงจากต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ มาเพาะบนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น 0.7% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 แต่ใส่น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ได้แก่ ซูโครส, ฟรุกโทส และซอร์บิทอล ชนิดละ 2.0% บ่มเนื้อเยื่อภายใต้สภาพเดียวกันกับข้อ 2.5.1.1 สังเกตและวัดค่าต่าง ๆ เหมือนข้อ 2.7.1

2.8 <u>การตรวจสอบและวิเคราะห์ความแปรปรวนของการผลิตน้ำมันและกรดไขมันในแคลลัสคำฝอย</u>

2.8.1 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยผ่านการชักนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์ EMS

นำใบเลี้ยงของต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ มาให้สาร EMS ตามภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.5 คือ แช่ชิ้นส่วนใบเลี้ยงในสารละลาย EMS ความเข้มข้น 0.8% ซึ่งเตรียมในอาหารเหลวสูตร MS ที่ปราศจากสารควบคุมการเจริญเติบโต ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 และใส่สารตัวพา คือ DMSO 4.0% เป็นเวลานาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส แล้วล้างตามด้วยน้ำขจัดไอออนนึ่งฆ่าเชื้อ 5 ครั้ง เพาะใบเลี้ยงลงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 2.0% วุ้น 0.7% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 บ่มเนื้อเยื่อไว้ในสภาพที่ไม่ให้แสง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่ใช้สาร EMS และ DMSO ทำการเก็บตัวอย่างแคลลัสภายหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยแยกแคลลัสออกจากใบเลี้ยงนำมารวมกัน แบ่งแคลลัสสด 1 กรัม จำนวน 5 ซ้ำต่อกรรมวิธี นำไปสกัดน้ำมัน เตรียมกรดไขมันในรูปอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ (fatty acid methylester) และวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันด้วยวิธีแก๊สโครมาโท-กราฟี (Gas chromatography ; GC) ตามวิธีการในข้อ 2.8.3 และแบ่งแคลลัสสด 1 กรัม จำนวน 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี นำไปหาน้ำหนักแห้ง

2.8.2 แคลลัสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงโดยไม่ผ่านการชักนำด้วยสารก่อกลายพันธุ์

2.8.2.1 อายุของชิ้นส่วนพืช

ตัดแยกชิ้นส่วนใบเลี้ยงจากต้นกล้าอายุ 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่เติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 2.0% วุ้น 0.7% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 เลี้ยงในสภาพที่ไม่ให้แสง อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างแคลลัสภายหลังจากที่เพาะเลี้ยงนาน 2 สัปดาห์ โดยแยกแคลลัสออกจากใบเลี้ยงนำมารวมกันแล้วแบ่งแคลลัสสด 1 กรัม จำนวน 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี นำไปสกัดน้ำมัน ทำกรดไขมันให้อยู่ในรูปอนุพันธุ์เมทิลเอสเทอร์ และวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโท-กราฟี ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.8.1 และแบ่งแคลลัสสด 1 กรัม จำนวน 3 ซ้ำต่อกรรมวิธี นำไปหาน้ำหนักแห้ง

2.8.2.2 ชนิดของอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

ใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 2.8.2.1 โดยเตรียมแคลลัสจากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงจากต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ บนอาหารแข็งสูตรต่าง ๆ ได้แก่ MS, LS, B5 และ SH

แต่ละสูตรเติม NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ซูโครส 2.0% วุ้น 0.7% มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 นำแคลลัสที่ได้ไปสกัดน้ำมันและวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

2.8.2.3 ชนิดของสารควบคุมการเจริญเติบโต

ใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 2.8.2.1 โดยเตรียมแคลลัสได้จากการเพาะเลี้ยงใบเลี้ยงจากต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มีสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มออกซินชนิดต่าง ๆ ได้แก่ NAA, IAA, IBA และ 2,4-D ชนิดละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร และสารควบคุมการเจริญเติบโตในกลุ่มไซโทไคนินชนิดต่าง ๆ ได้แก่ BA และ Kinetin ชนิดละ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ใส่ซูโครส 2.0% วุ้น 0.7% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 นำแคลลัสที่ได้ไปสกัดน้ำมันและวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

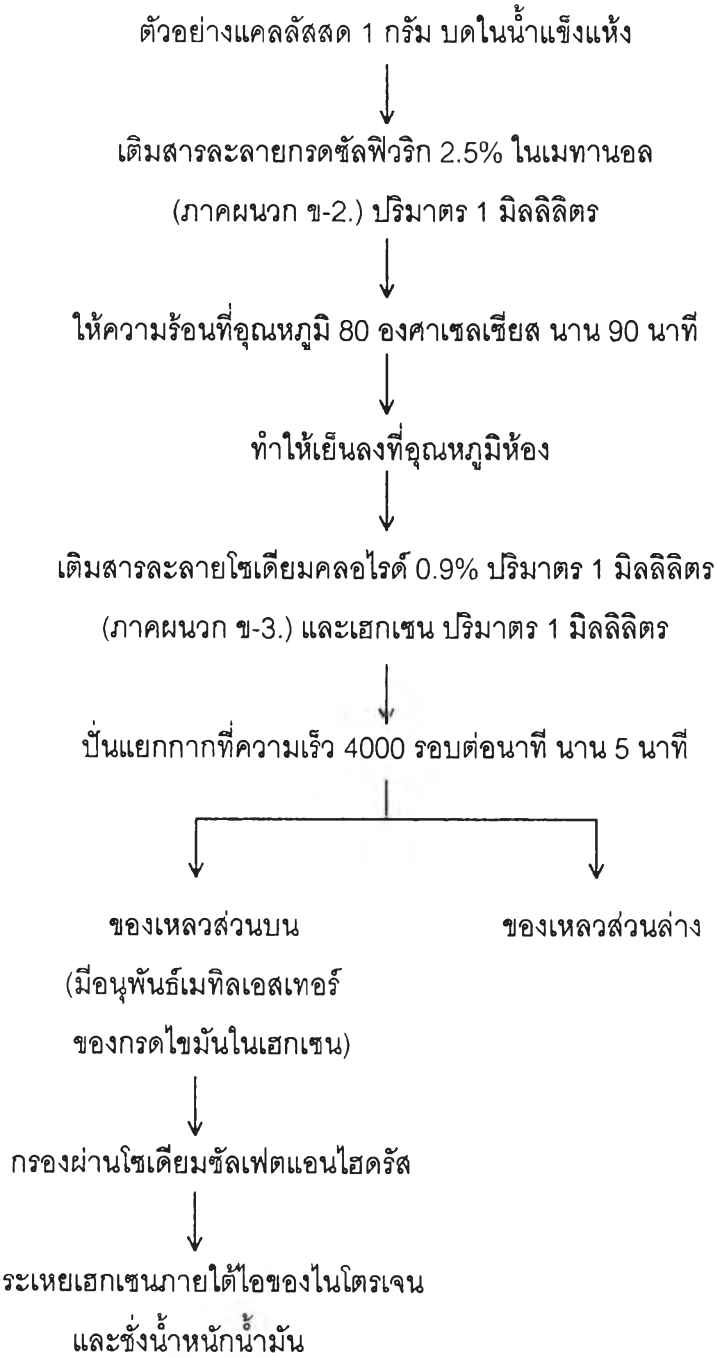
2.8.2.4 ชนิดของแหล่งคาร์บอน

ใช้วิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 2.8.2.1 โดยเตรียมแคลลัสได้จากการเพาะใบเลี้ยงของต้นกล้าอายุ 2 สัปดาห์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่มี NAA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร BA 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร วุ้น 0.7% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 5.7 แต่ใส่น้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน ได้แก่ ซูโครส, ฟรุกโทส และซอร์บิทอล ชนิดละ 2.0% นำแคลลัสที่ได้ไปสกัดน้ำมันและวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมัน

2.8.3 การวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำมันด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี

2.8.3.1 การสกัดน้ำมันและเตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ในขั้นตอนเดียว

ใช้วิธีการของ Miquel และ Browse (1992) สกัดน้ำมันจากตัวอย่างแคลลัสพร้อมกับเตรียมกรดไขมันให้อยู่ในรูปเมทิลเอสเทอร์ในขั้นตอนเดียว มีวิธีดำเนินการตามรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 การสกัดน้ำมันและเตรียมอนุพันธ์เมทิลเอสเทอร์ในขั้นตอนเดียว
(Miquel and Browse, 1992)

2.8.3.2 การวิเคราะห์กรดไขมันด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

นำตัวอย่างน้ำมันที่สกัดได้จากแคลลัสของคำฝอยและผ่านการเตรียมกรดไขมันให้อยู่ในรูปอนุพันธุ์เมทิลเอสเทอร์ตามวิธีการในข้อ 2.8.3.1 มาทำการวิเคราะห์เพื่อหาชนิดและปริมาณกรดไขมันด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี โดยใช้ภาวะในการวิเคราะห์ดังนี้

ปริมาณที่ฉีด	:	1 ไมโครลิตร
คอลัมน์	:	SE-30 capillary (General Electric Co.) ยาว 30 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 0.25 ไมโครเมตร
ดีเทคเตอร์	:	FID
โปรแกรมอุณหภูมิ	:	อุณหภูมิเริ่มต้น 135 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที อัตราเพิ่มอุณหภูมิ 135-185 องศาเซลเซียส ; 2 องศาเซลเซียส ต่อนาที, 185-187 องศาเซลเซียส ; 0.2 องศาเซลเซียส ต่อนาที, 187-235 องศาเซลเซียส ; 3 องศาเซลเซียส ต่อนาที อุณหภูมิสุดท้าย 235 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที
อุณหภูมิอินเจคเตอร์	:	250 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิดีเทคเตอร์	:	250 องศาเซลเซียส
ความดันของแก๊สไนโตรเจน	:	1 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร
ความดันของแก๊สไฮโดรเจน	:	0.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร
ความดันของ Air supply	:	0.5 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร

ทำการเปรียบเทียบเวลาชะ (retention time) จากโครมาโทแกรม (chromatogram) ของตัวอย่างกับกรดไขมันมาตรฐานเพื่อหาชนิดกรดไขมัน หาปริมาณกรดไขมันจากกราฟมาตรฐานของกรดไขมันแต่ละชนิดที่เตรียมได้โดยวิธี Internal standard (ภาคผนวก ค)